

## miR-23a 和 miR-125b 在进展期结直肠癌中表达水平的研究

李志发, 陈戎, 吴小兵, 黎淑玲(广东省广州市广州医科大学附属第三医院胃肠外科, 广东广州 510150)

**【摘要】** 目的 分析 miR-23a 和 miR-125b 作为结直肠癌(Colorectal Cancer, CRC)诊断标记的潜能,并分析肿瘤分期对 miR-23a 和 miR-125b 表达水平的影响。方法 采用实时定量 PCR(RT-qPCR)分析 miR-23a 在 CRC 患者肿瘤和瘤旁组织之间的表达谱,并分别分析 miR-23a 和 miR-125b 在 II、III 期 CRC 中的表达水平。结果 miR-23a 和 miR-125b 在 II、III 期 CRC 患者及混合样本中的均为下调表达,且 miR-125b 在三组结直肠中下调表达均具有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 miR-23a 和 miR-125b 具有作为结直肠癌诊断标记的潜能,但肿瘤分期对 miR-23a 和 miR-125b 的表达水平不一定具有明显影响。

**【关键词】** 结直肠肿瘤; miR-23a; miR-125b; 生物标记; 诊断标记

**The levels of miR-23a and miR-125b in the expression of advanced stages of colorectal cancer: an observational study** LI Zhi-fa, CHEN Rong, WU Xiao-bing, LI Shu-ling. Department of Gastrointestinal Surgery, The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangdong Province, Guangzhou 510150, P.R. China

Corresponding author: LI Zhi-fa, Email: hardy-2000@sohu.com

**【Abstract】** **Objective** Aim to confirm miR-23a and miR-125b as potential diagnostic markers of colorectal cancer (CRC), and evaluate the effect of tumor staging using the miR-23a and miR-125b expression level. **Method** Real-time quantitative PCR (RT-PCR) analysis of the expression profile of miR-23a in the CRC tumors and adjacent tumor organizations, and were analyzed miR-23a and miR-125b expression levels at stage II, III CRC. **Result** Both miR-23a and miR-125b were down-regulated in stage II, III CRC tumors and mixed samples, and miR-125b was down-regulated in all three groups ( $P<0.05$ ). **Conclusions** MiR-23a and miR-125b are potentially diagnostic markers for CRC, but the tumor staging does not necessarily have a significant effect on the expression levels of miR-23a and miR-125b.

**【Key words】** Colorectal Cancer; miR-23a; miR-125b; Biomarkers; Diagnostic marker

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)作为严重影响人类健康的恶性肿瘤之一,全球每年有 50 万人因结直肠癌致死<sup>[1]</sup>。但是截至目前,CRC 的诊断仍缺乏敏感性和特异性较高的工具。例如:粪便潜血实验敏感性较低;肠镜检查是侵入性检查,会导致患者强烈不适感;临床广泛使用的 CA19-9 和 CEA 标记物在多种肿瘤中均有涉及,比如结直肠癌、肝癌、胰腺癌、肺癌和胃癌,但是其敏感性和特异性均较低,尤其对肿瘤的早期筛查

更不理想<sup>[2,3]</sup>。

MicroRNA (miRNA) 是一类非编码的单链小 RNA,miRNA 能够调控与肿瘤预后相关的基因,并在肿瘤的进展、侵袭及转移过程中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。研究表明高表达 miRNA 能够促进肿瘤生长,而低表达 miRNA 能够抑制肿瘤发生<sup>[4]</sup>。Berber 等<sup>[5]</sup>发现,miR-205、miR-200c、miR-125b 和 miR-181a 等分子标记物在乳腺癌中表达水平明显下调,而且 miR-200c 和 miR-205 可能和肿瘤的淋巴转移密切相关。研究表明,miR-23a 在 EGF/c-MYC 信号通路调控的乳腺癌转移中发挥重要作用,miR-23a 能够通过调控拓扑异构酶 1 的表达

基金项目:MicroRNA-490-3p 靶向 TGFBR1 对结直肠癌侵袭转移的分子机制研究(2016114104437517)

通信作者:李志发, E-mail: hardy-2000@sohu.com

进而调节肝癌对化疗药物的敏感性<sup>[6]</sup>。本研究通过检测 miR-23a 和 miR-125b 标记物在 CRC 中的表达水平,进一步评估 miR-23a 和 miR-125b 作为诊断 CRC 标记物的潜能。

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料和实验材料

本研究从广州医科大学附属第三医院胃肠外科收集了 29 例 CRC 病人的新鲜组织样本。所有标本的获取均已取得病人的知情同意并签署了同意书。所有病例均经术后病理科确诊,术前均未做放、化疗处理,取肿瘤组织和配对的距离肿瘤边缘 5 cm 以上的癌旁组织,标本采集后迅速放至液氮中暂存并送入-80℃超低温冰箱保存备用。实验材料包括:RNAzol 试剂盒,All-in-One™ cDNA 合成试剂盒及 qPCR 试剂,反转录试剂盒和荧光定量 PCR 试剂盒,扩增仪器 MyiQ™ 和 PCR 仪,紫外分光光度仪。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 miRNA 的提取及质量检测

取-80℃保存的组织标本约 100 mg,于液氮中研磨至粉末状,按照 RNAzol 试剂盒说明书提取 miRNA。利用紫外分光光度仪测定样品 miRNA 的吸光度比值(A260/A280),比值在 1.7-1.9 认为达到要求。同时采用甲醛变性凝胶电泳检测样本 miRNA 纯度。

#### 1.2.2 实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR)

严格按照 All-in-One™ cDNA 合成试剂盒说明书对样本 miRNA 进行反转录,加入 MS2RNA 作为外参基因反转录,同时单独反转录 MS2RNA。反转录的反应条件:37℃ 60 min,85℃ 5 min,所得的反转录产物用灭菌水稀释 10 倍后进行扩增反应,扩增条件:95℃ 10 min;90℃ 10 s、60℃ 20 s、72℃ 10 s,40 个循环;然后 65℃ 10 s,60 个循环,进行溶解并观察溶解曲线。采用 U6 RNA 作为本实验的内参基因,所有的反应均设有 3 个复孔并设外参和空白对照。反应中加入 ROX 以平衡每孔反应容量的误差。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法计算 miRNA 在样本组织中的相对表达量,其中  $\Delta\Delta CT = (CT_{\text{肿瘤}} - CT_{\text{内参}}) - (CT_{\text{正常}} - CT_{\text{内参}})$ 。 $2^{-\Delta\Delta CT}$  小于 1 表示肿瘤组织中 miRNA 表达水平低于癌旁正常组织; $2^{-\Delta\Delta CT}$  大于 1 表示肿瘤组织中 miRNA 表达水平较癌旁正常组织高; $2^{-\Delta\Delta CT}$  等于 1 表示肿瘤组织中 miRNA 表达水平和癌旁正常组织 miRNA 表达水平相同。

#### 1.2.3 统计与分析

本研究采用 SPSS 16.0 统计

分析软件进行数据分析。运用非配对 *t* 检验方法对 miR-23a 和 miR-125b 在 CRC 的表达水平进行统计分析和组间差异比较, $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 miR-23a 和 miR-125b 在 II 期 CRC 中的表达情况

相对于癌旁正常组织,我们发现 miR-23a 标记物在 II 期 CRC 中的表达水平下降了 1.70 倍( $P=0.375$ ),结果无临床意义(图 1A);miR-125b 标记物在 II 期 CRC 中的表达水平下降了 5.40 倍( $P=0.024$ ),结果具有明显临床意义(图 1B)。

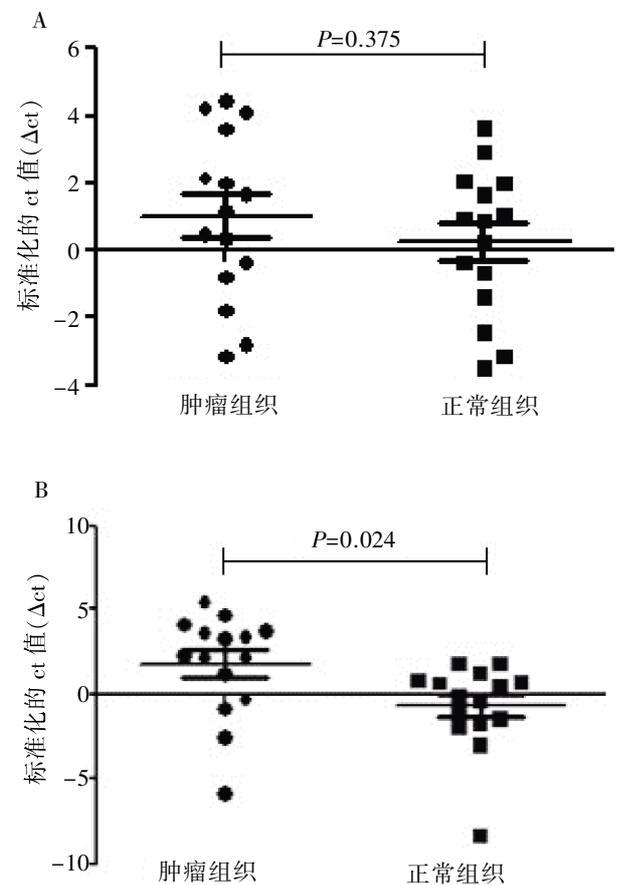


图 1 miR-23a (A) 和 miR-125b (B) 在 II 期 CRC 组织及其配对的癌旁正常组织中的表达情况

### 2.2 miR-23a 和 miR-125b 在 III 期 CRC 中的表达情况

相对于癌旁正常组织,本研究发现 miR-23a 标记物在 III 期 CRC 中的表达水平下降了 4.57 倍( $P=0.009$ ),结果具有显著统计学意义(图 2A);miR-125b 标记物在 III 期 CRC 中的表达水平下降了 3.01 倍( $P=0.038$ ),结果具有明显临床意

义(图 2B)。

2.3 miR-23a 和 miR-125b 在 II、III 期混合 CRC 样本中的表达情况 相对于癌旁正常组织,我们发现 miR-23a 标记物在 CRC 混合样本中的表达水平下降了 2.70 倍( $P=0.017$ ),结果具有临床意义(图 3A);同时 miR-125b 标记物在 CRC 混合样本中的表达水平下降了 4.13 倍( $P=0.002$ ),结果也具有显著的临床意义(图 3B)。

### 3 讨论

CRC 作为最常见的恶性肿瘤之一,严重危害着人们的生命健康和生活质量。提高 CRC 的诊断率,尤其是早期诊断率,对延长患者生存期以及提高远期预后有着非常重要的意义。大量研究表明,miRNAs 具有作为多种肿瘤包括 CRC 的诊断标记物的潜能,能够显著提高 CRC 诊断的敏感性和特异性<sup>[6]</sup>。miR-17-3p 和 miR-92a 在 CRC 患者术后的血浆中的表达水平明显下降,并且 miR-92a 能够鉴别 CRC 和其他消化道肿瘤<sup>[7]</sup>。

MiR-1 和 miR-551b 在 CRC 中的表达水平明显下降,同时 miR-1 与 CRC 的发生发展密切相关<sup>[8,9]</sup>。MiR-21 和 miR-106a 在 CRC 中的表达水平明显高于正常人群<sup>[10]</sup>。有趣的是,xi 等<sup>[11]</sup>研究结果表明 miR-23a 在 CRC 中明显低表达;与之相反,Yong 等<sup>[12]</sup>研究发现 miR-23a 在 CRC 中表达水平明显升高。因此,在临床应用之前,miRNA 是否能够作为 CRC 的诊断标记物仍需要大量临床试验进一步验证。

本研究采用 qRT-PCR 方法对 miR-23a 和 miR-125b 在 CRC 中的表达水平进行初步探究。该部分研究结果提示:miR-23a 和 miR-125b 在 II、III 期及混合 CRC 样本中的表达均有下调,而且 miR-125b 在三组结直肠样本中的表达水平变化均具有统计学意义( $P<0.05$ )。此外,miR-23a 在 III 期 CRC 样本( $P=0.009$ )和混合 CRC 样本( $P=0.017$ )中的表达水平皆下调,结果均具有统计学意义,而 miR-23a 在 II 期 CRC 样本中表达也下调( $P=0.375$ ),提示 miR-23a 在 II 期 CRC 中的表达

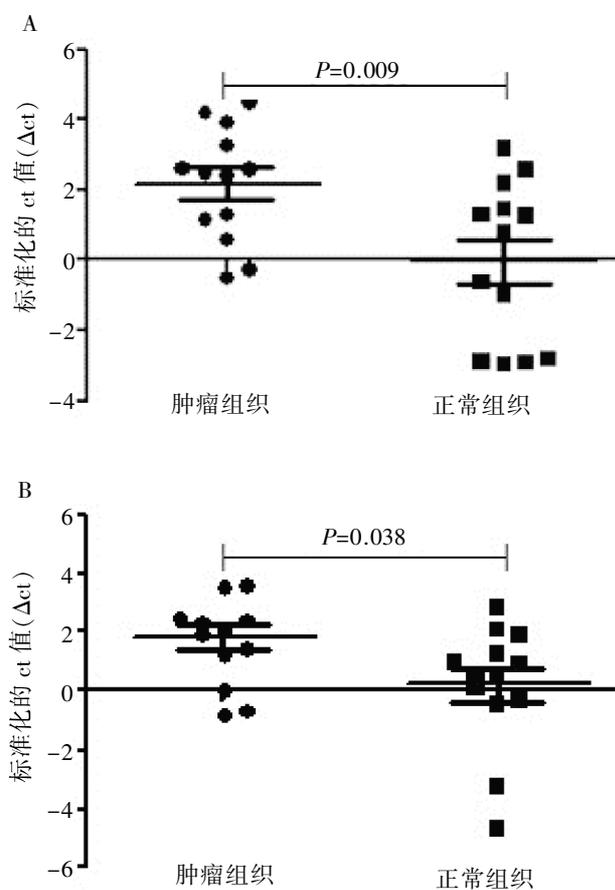


图 2 miR-23a(A) 和 miR-125b(B) 在 III 期 CRC 组织及其配对的癌旁正常组织中的表达情况

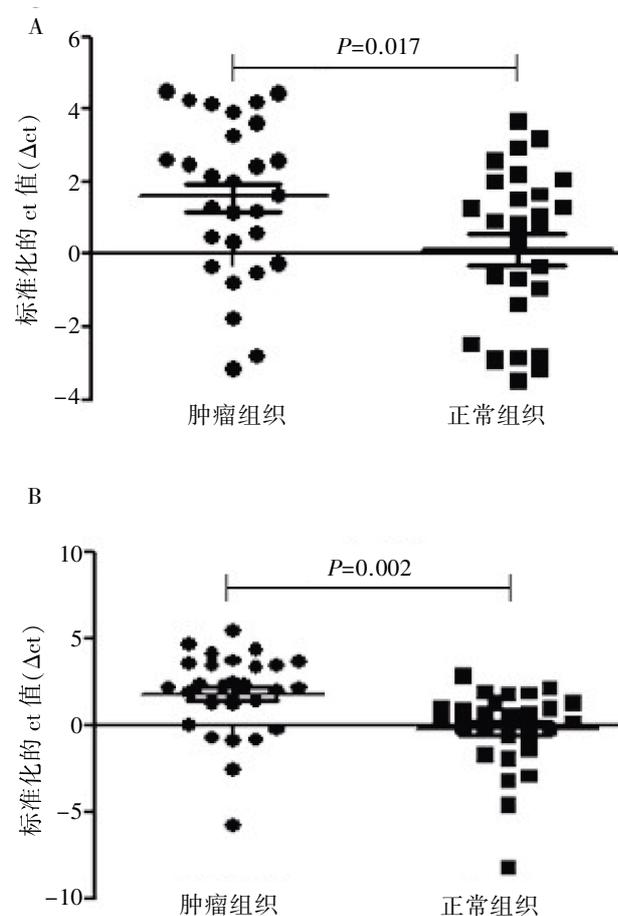


图 3 miR-23a(A) 和 miR-125b(B) 在 II 期和 III 期混合 CRC 组织及其配对的癌旁正常组织中的表达情况

不具有统计学的意义。然而,本研究未对其控制的下游基因进一步评估。以往的研究报道表明,miR-23a 和 miR-125b 与多种恶性肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[12]</sup>。MiR-23a 可通过调控转移抑制因子 1 (metastasis suppressor 1, MTSS1) 促进 CRC 细胞的侵袭和转移<sup>[13]</sup>。此外,miR-125 b 通过作用靶基因基质金属蛋白酶 13 (Matrix metalloproteinase 13, MMP13)抑制膀胱癌的侵袭和转移<sup>[14]</sup>。

综上所述,本研究证实 miR-23a 和 miR-125b 在 CRC 中的表达水平均有不同程度下降。然而,miR-23a 和 miR-125b 是否能够作为诊断 CRC 的临床筛查指标,仍需要进一步的体外和体内实验进一步论证。

#### 参考文献

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2013,63(1): 11-30.
- [2] Ogata-Kawata H, Izumiya M, Kurioka D, et al. Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer [J]. *PLoS One*, 2014,9(4): e92921.
- [3] Locker G Y, Hamilton S, Harris J, et al. ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2006,24(33): 5313-5327.
- [4] Tang J, Ahmad A, Sarkar F H. The role of microRNAs in breast cancer migration, invasion and metastasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2012,13(10): 13414-13437.
- [5] Berber U, Yilmaz I, Narli G, et al. miR-205 and miR-200 c: Predictive Micro RNAs for Lymph Node Metastasis in Triple Negative Breast Cancer [J]. *J Breast Cancer*, 2014,17(2): 143-148.
- [6] Wang N, Zhu M, Tsao S W, et al. MiR-23 a-mediated inhibition of topoisomerase 1 expression potentiates cell response to etoposide in human hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Cancer*, 2013,12(1): 119.
- [7] Ng E K, Chong W W, Jin H, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening [J]. *Gut*, 2009,58(10): 1375-1381.
- [8] Sarver A L, French A J, Borralho P M, et al. Human colon cancer profiles show differential microRNA expression depending on mismatch repair status and are characteristic of undifferentiated proliferative states [J]. *BMC Cancer*, 2009,9: 401.
- [9] Guo J, Miao Y, Xiao B, et al. Differential expression of microRNA species in human gastric cancer versus non-tumorous tissues [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009,24(4): 652-657.
- [10] Link A, Balaguer F, Shen Y, et al. Fecal MicroRNAs as novel biomarkers for colon cancer screening [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010,19(7): 1766-1774.
- [11] Xi Y, Shalgi R, Fodstad O, et al. Differentially regulated microRNAs and actively translated messenger RNA transcripts by tumor suppressor p53 in colon cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2006,12(7 Pt 1): 2014-2024.
- [12] Yong F L, Law C W, Wang C W. Potentiality of a triple microRNA classifier: miR-193 a-3 p, miR-23 a and miR-338-5 p for early detection of colorectal cancer [J]. *BMC Cancer*, 2013,13: 280.
- [13] Jahid S, Sun J, Edwards R A, et al. miR-23 a promotes the transition from indolent to invasive colorectal cancer [J]. *Cancer Discov*, 2012,2(6): 540-553.
- [14] Wu D, Ding J, Wang L, et al. microRNA-125 b inhibits cell migration and invasion by targeting matrix metalloproteinase 13 in bladder cancer [J]. *Oncol Lett*, 2013,5(3): 829-834.

(收稿日期:2018-02-18)